

Bitki Biyoteknolojisinde Moleküler Markörler

Ertuğrul FİLİZ¹ İbrahim KOÇ²

¹Düzce Üniversitesi, Çilimli Meslek Yüksek Okulu, Düzce

²Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Kocaeli

Özet: Biyoteknoloji, günümüzde en popüler ve yeniliklere açık bilimsel alanların başında gelmektedir. Bitki biyoteknolojisi de bu alanlardan biridir ve bu alanda kullanılan moleküler markör teknolojileri çok önemli bir biyoteknolojik araç olarak karşımıza çıkmaktadır. Moleküler markör ile genomda herhangi bir gen bölgesi ya da gen bölgesi ile ilgili DNA parçası temsil edilmektedir. Polimer Zincir Reaksiyonunun (PCR) keşfinden sonra Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizm (AFLP), Basit Dizi Tekrarları (SSR), Dizi İlişkili Çoğaltılmış Polimorfizm (SRAP), Tek Nükleotid Polimorfizmi (SNP) ve Basit Tekrarlı Diziler Arası Polimorfizm (ISSR) gibi yaygın olarak kullanılan çok sayıda moleküler markör teknikleri geliştirilmiştir. Bu markör teknolojileri fiziksel haritalama, gen keşfi ve etiketleme, filogenetik çalışmalar, evrimsel genetik ve genetik çeşitlilik çalışmaları gibi pek çok alanda etkin şekilde kullanılmaktadırlar. Sonuç olarak, moleküler markörler bitki biyoteknolojisi çalışmalarına çok önemli boyutlar kazandırmış, daha etkili ve hızlı bilimsel sonuçların alınmasına imkân sağlamıştır. Bu çalışmada, bitki biyoteknolojisinde kullanılan moleküler markör teknolojilerinin genel prensipleri, avantajları-dezavantajları ve uygulama alanlarından bahsedilmiştir.

Anahtar kelimeler: Biyoteknoloji, bitki biyoteknolojisi, moleküler markör, PCR.

Molecular Markers in Plant Biotechnology

Abstract: At present, biotechnology is one of scientific fields that is the most popular and open to latest advances. Plant biotechnology is one of these fields and molecular marker technologies used in this area appears to be an important biotechnological tool. With molecular marker, any gene in the genome or gene region related with any piece of DNA is represented. After the discovery of Polymerase Chain Reaction (PCR), a large number of molecular marker techniques which are commonly used have been developed such as Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP), Simple Sequence Repeats (SSR), Sequence-Related Amplified Polymorphism (SRAP), Single Nucleotide Polymorphism (SNP) and Inter Simple Sequence Repeat (ISSR). These marker technologies are used effectively in many fields such as physical mapping, gene discovery and tagging, phylogenetic studies, evolutionary genetic and genetic diversity studies. As a result, molecular markers have brought expansive dimensions in plant biotechnology studies, enabling to get more efficient and rapid scientific results. In this study, general principles, advantages-disadvantages and application areas of molecular marker technologies used in biotechnology are discussed.

Key words: Biotechnology, plant biotechnology, molecular marker, PCR.

1.Giriş

Moleküler markör teknikleri, bireyler arasındaki DNA dizilerinin farklarını ortaya çıkarmakta kullanılan ve son yirmi yılda biyolojik bilimlerde devrim etkisi yapmış uygulamalardır. Başka bir ifadeyle moleküler markör, genom içinde bir DNA parçasının farklılıklarını temsil eder ve bu farklılıklar eklenmeler, silinmeler, yer değiştirmeler, duplikasyonlar gibi olaylardan meydana gelebilir. DNA temelli moleküler markörler taksonomi, fizyoloji, embriyoloji, genetik mühendisliği vb. alanlarda kullanılan çok yönlü araçlardır (Schlotterer, 2004). Polimer zincir reaksiyonunun (PCR) bulunmasından sonra DNA markörleri kullanılarak gen etiketleme, genetik haritalama, harita temelli tarımsal açıdan önemli genlerin belirlenmesi, genetik çeşitlilik

çalışmaları, filogenetik analizler, markörler yardımıyla seleksiyon (MAS) çalışmaları kolaylaşmıştır (Joshi ve ark., 2000). İdeal bir moleküler markör tekniğinin;

a- Polimorfik olması ve bütün genomda kullanılması

b- Genetik farklılıkların ortaya çıkarılmasında yeterli olması

c- Çok sayıda, bağımsız ve güvenilir markörler üretmesi

d- Basit, hızlı ve ucuz olması

e- Az miktar DNA veya doku ihtiyacı gerektirmesi

f- Farklı fenotiplerle bağlantı oluşturması gibi özelliklere sahip olması avantajdır ama hiçbir markör tekniği bu avantajların tümüne birden sahip değildir. Moleküler markör

teknikleri kullanım amacına paralel olarak farklı kriterlere göre gruplandırılabilir;

I. Geçiş türüne göre (biparental çekirdek kalıtımı, maternal çekirdek kalıtımı, maternal organel kalıtımı, paternal organel kalıtımı)

II. Gen aksiyonuna göre (dominant ve kodominant markörler)

III. Analiz metotlarına göre (PCR temelli olmayan = Hibridizasyon ve PCR temelli markörler) (Kesawat ve Das, 2009)

Bu derlemede bitki biyoteknolojisi çalışmalarında yaygın olarak kullanılan moleküler markör teknikleri analiz metotlarına göre sınıflandırılarak değerlendirilmiştir.

2. PCR Temelli Olmayan Teknikler

2.1. RFLP (Sınırlı Parça Uzunluk Polimorfizmi)

RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) hibridizasyon temelli kullanılan en yaygın moleküler markör tekniğidir ve DNA polimorfizminin tespitinde, restriksiyon (endonükleaz) enzimleriyle kesilen DNA parçaları jel elektoroforezinde yürütüldükten sonra nitroselüloz membran üzerine transfer edilir, kimyasal etiketli problarla hibridize edilir ve farklı DNA parçaları ortaya çıkarılmış olur. Bu farklı DNA profilleri eklenme, silinme, nükleotid değişimi veya tek nükleotid polimorfizmi (SNP) gibi nedenlerden oluşabilmektedir. RFLP markörleri yüksek polimorfizme sahip, kodominant ve tekrarlanabilirliği yüksektir. DNA blotları farklı problarla tekrar analiz edilebilme imkânına sahiptir ve problar genelde türe özeldir. Tek veya çoklu lokuslara yönelik olarak cDNA veya genomik kütüphanelerden elde edilmiş olup büyüklükleri 0.5–3.0 kb'den oluşur. RFLP analizlerinde sınırlayıcı faktörler, fazla miktarda ve kaliteli DNA ihtiyacı, probların pahalı ve toksik olması, fazla zaman ihtiyacı ve yoğun iş gücü gerektirmesidir (Young ve ark., 1992). RFLP, popülasyon ve tür içi genetik çeşitlilik ve filogenetik çalışmalarında, gen haritalamalarda, yakın akraba taksonlarının ilişkilerinin incelenmesi ve gen akışı tespitlerinde kullanılmaktadır (Miller ve Tanksley, 1990; Desplanque ve ark., 1999).

3. PCR Temelli Teknikler

PCR keşfinden sonra (Mullis ve Faloona, 1987) moleküler biyoloji

çalışmalarının hızı ve sayısında artış olmuş ve özellikle PCR temelli markör çalışmalarına çok fazla sayıda yeni yaklaşımlar eklenmiştir. PCR kısaca, canlı organizma kullanmadan az miktarda DNA ve enzim kullanılarak gerekli kimyasalların (dNTP, tampon çözelti vb.) yardımıyla yapılan DNA çoğaltma işlemidir.

3.1. RAPD (Tesadüfi Çoğaltılmış Polimorfik DNA)

RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), PCR tekniği kullanarak sentetik primerlerin yardımıyla (genelde 10 baz uzunluğunda) yapılan tesadüfi DNA parçası çoğaltımına dayanan bir metottur. Kullanılan primerler hem ön hemde ters primer görevi görür ve çoğaltılan parçacıkların büyüklüğü genelde 0.5–5 kb arasında değişmektedir. Polimorfizm, primerlerin bağlanma bölgelerinin çeşitliliği ve buna bağlı olarak oluşan farklı uzunluktaki DNA parçacıklarından kaynaklanmaktadır (Williams ve ark., 1990).

RAPD markör sisteminin avantajları arasında düşük miktarda DNA ihtiyacı, zaman tüketiminin az olması, primer tasarımının kolay olması, RAPD markörlerinin genomik dağılımının bol ve bütün genoma dağılmış olması sayılabilir. Buna karşın RAPD markör sisteminin dezavantajı ise tekrarlanabilirliğinin az olması ve bilgilendirme gücünün düşük olmasıdır.

RAPD markörleri lokus spesifik olmadıklarından band verileri lokus veya allellerin yorumlanması açısından uygun değildir ve benzer büyüklükteki parçalar homolog olmayabilirler (Kesawat ve Das, 2009).

RAPD markör sisteminin keşfinden sonra DAF (DNA Amplification Fingerprinting) ve AP-PCR (Arbitrary Primed-Polymerase Chain Reaction) olmak üzere RAPD sisteminin çeşitleri olan iki yöntem geliştirilmiştir. AP-PCR' da (Welsh ve McClelland, 1990), 10–15 nükleotid uzunluğunda tek nükleotid çeşidi kullanılmakta olup otoradyografi içerdiğinden pek yaygın değildir. DAF ise (Caetano-Anolles ve ark., 1991), 5-8 nükleotid uzunluğunda primerlerin kullanıldığı ve ürünlerin gümüş nitrat boyama yapılarak poliakrilamid jelde yürütüldüğü bir markör sistemidir.

3.2. AFLP (Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizm)

AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), RFLP tekniğinin etkinliği ile PCR temelli teknikleri birleştiren bir yöntemdir ve restriksiyon enzimleriyle parçalanmış ve 80–500 bp büyüklüğünde elde edilen DNA parçacıkları adaptörlerle ligasyona maruz bırakılıp en son basamakta PCR ile seçici çoğaltım uygulanır (Vos ve ark., 1995). İlk olarak restriksiyon enzimleriyle kesilen DNA'ların uçlarına adaptör denilen sentetik DNA dizileri bağlanır. Ligasyon ürünleri seçici nükleotid eklenmiş primerler kullanılarak çoğaltılır ve seçici nükleotid sayısı bir-üç arasında değişmektedir. İlk seçici çoğaltım, adaptöre komplementer bir seçici nükleotid ekli primerler, son seçici çoğaltımda ise üç seçici nükleotid ekli primerler kullanılarak çoğaltım gerçekleştirilir ve oluşan AFLP parçacıkları poliakrilamid jelde gözlenir. Yöntemde tek reaksiyonla 50–100 parçacık oluşur ve dolayısıyla polimorfizm oranı oldukça yüksektir. Yüksek orandaki tekrarlanabilir özelliği ve polimorfik bant sayısı, DNA kaynağından bağımsız olarak genomun tamamındaki polimorfizmlerin belirlenmesinde hızlı bir yöntem olması, ön dizi bilgisi gerektirmemesi, tür içi ve türler arası akrabalıkların belirlenmesinde (Althoff ve ark., 2007, kültür arası varyasyon veya akrabalık derecelerinin değerlendirilmesinde (Mian ve ark., 2002) etkin olmasından dolayı bitki genetik çeşitlilik çalışmalarında tercih edilmektedir.

3.3. Minisatellit

VNTR (Variable Number Tandem Repeats - Değişken Sayılı Ardışık Tekrarlar) markörleri, farklı uzunlukta tekrar dizilerini içeren mikrosatellit ve minisatellit markörleri içermektedir. Minisatellitler genomda 4–20 kb büyüklüğü arasında değişen ve çoklu lokus problemleriyle hibridize olan markörlerdir (Jeffreys ve ark., 1985). Tekrar ünitelerinin sayılarındaki varyasyon nedenleri arasında eşit olmayan krossing-over veya gen dönüşleri (gene conversion) ana nedenler arasında görülmektedir. Minisatellit bölgelerindeki yüksek mutasyon oranları polimorfizm oranlarını artırmakta ve populasyonlardaki

bireylerin çoklu lokus profillerini farklılaştırmaktadır (Nakamura ve ark., 1987). Minisatellitlerin temel avantajları yüksek polimorfizm ve tekrarlanabilirliktir. Benzer büyüklükte elde edilen DNA parçacıkları homolog olmama ihtimali ve band profillerinin lokuslar veya alleller açısından yorumlanmaması dezavantajları arasında sayılabilir.

3.4. Mikrosatellit

Basit dizi tekrarları (SSR-Simple Sequence Repeats) olarak bilinen mikrosatellitler, DNA dizilerinde tekrar edilen en küçük birimlerdir ve tekrar motifleri 1–6 bp arasında değişmektedir. Mikrosatellitleri çevreleyen bölgelerin dizileri (flanking region) biliniyorsa o bölgelere uygun primerler tasarlanarak (genelde 20–25 bp uzunluğunda) PCR ile çoğaltımı yapılabilmektedir. Bunun yanında, akraba türler arası SSR primerleri farklı canlılarda kullanılabilir. DNA replikasyonu sırasında meydana gelen dizi atlama, yanlış baz eşleşmeleri ve eşit olmayan krossing-over olayları mikrosatellit sayılarının farklılığına neden olan temel olaylardır ve jel elektroforeziyle belirlenmektedir (Matsuoka ve ark., 2002). Mikrosatellit markörler, az DNA gerektirmesi, kodominant ve kararlı markör sistem olması, genomda bol ve dağınık bulunması, tekrarlanabilir ve otomasyona uygun olması, yüksek polimorfizm barındırması, bilgilendirici bir markör sistemi oluşundan dolayı populasyon genetiği ve gen haritalama çalışmalarında etkin olarak kullanılabilir (Powell ve ark., 1996). Bu markör sisteminin dezavantajı ise mikrosatellit bölgelerinin mutasyon oranlarının yüksek olması primer bağlanma bölgelerinde değişmeye neden olmakta ve böylece anlamsız allellerin oluşmasına imkân sağlamaktadır. Böylece genotipik ve allelik frekansların doğru yorumlanmaması bazı tartışmalara da yol açmaktadır (Freudenreich ve ark., 1997).

3.5. ISSR (Basit Tekrarlı Diziler Arası Polimorfizm)

ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) tekniğinde, ikili, üçlü, dördü ve beşli tekrarlanan nükleotitlere sahip primerler kullanılmakta, bu primerlerle iki mikrosatellit

arası bölge çoğaltılabilmekte ve elde edilen PCR ürünleri agaroz jelde yürütülerek etidyum bromür ile boyandıktan sonra belirlenebilmektedir (Zietkiewicz ve ark., 1994). Kullanılan primerlerle genomik lokuslar farklı bant büyüklüklerinde çoğaltılmakta, primerler genelde 3' veya 5' uçlarının sonlarındaki mikrosatellit bölgelerine uzanan 1–4 dejenere nükleotit içermekte ve uzunlukları 15–30 nükleotit arasında değişmektedir. Primerlerdeki GC oranının fazla olması bağlanma sıcaklığının yüksek olmasına yol açarken buna karşılık kararlı bağlanmayı sağlar ve bu nedenle her bir primerin DNA'ya yapışma sıcaklığı içeriğindeki baz kompozisyonuna göre belirlenir. Çoğaltılmış ürünler genelde 200–2000 bp arası uzunluktadır. ISSR, dominant markördür ve dizi bilgisi gerekmeden primer dizaynı yapılabilmesi avantajlarından biridir (Joshi ve ark., 2000). Yüksek polimorfizm ve üretkenlik göstermesi ISSR analizlerini genetik benzerlik, gen haritalama ve taksonomi çalışmalarında uygulanabilir kılmaktadır (Gupta ve ark., 1994; Zietkiewicz ve ark., 1994). Bu markör sisteminde de RAPD markör sisteminde olduğu gibi tekrarlanabilirliğinin düşük olması ve benzer büyüklükteki parçacıkların homolog olmaması dezavantajları arasında sayılabilir (KesawatveDas, 2009).

3.6. SNP (Tek Nükleotid Polimorfizmi)

Popülasyonlardaki bireylerin genom dizilerinde meydana gelen tek nükleotid değişimleri olarak bilinen SNP (Single Nucleotide Polymorphism), bitkilerinde dahil olduğu pek çok canlı türünde ortaya çıkan bir varyasyondur. SNP oluşmasında eklenme ve silinme (InDel) nükleotid dizisi değişimine neden olan temel nedenlerdendir; gen haritalamada, markörler yardımıyla ıslah ve harita temelli klonlama çalışmalarında etkili bir araç olarak kullanılmaktadır. SNP oluşumları genelde kodlama yapmayan DNA bölgelerinde yaygın olarak görülmektedir veya kodlama yapan bölgelerde meydana gelirse aminoasit dizisinin değişimine neden olabileceği gibi aminoasit dizisinde herhangi bir değişikliği neden olmayabilir ve gen ürününde değişiklik olmaz (Sunyaev ve ark., 1999). Mısır bitkisinde ortalama her 60–120 baz çiftinde bir

SNP' ye sahipken (Ching ve ark., 2002), insanlarda tahminen 1000 baz çiftinde bir SNP' ye rastlanılmaktadır (Sachidanandam ve ark., 2001). Dizileme teknolojilerinin gelişmesine paralel olarak, EST kökenli DNA dizi temelli genetik varyasyon çalışmaları yaygın olarak yapılmaktadır (Soleimani ve ark., 2003). Son yıllarda SNP karakterizasyon çalışmalarında kullanılan allel spesifik hibridizasyon veya allel-spesifik oligonükleotid hibridizasyon (ASO), farklı DNA hedeflerindeki tek nükleotid pozisyonlarını hibridizasyon temelli tanımlanmasıdır. Hibridizasyon temelli problemlerde hatalı eşleşmeler olabilmekte ve bundan dolayı da daha dikkatli bir prob tasarımı ve hibridizasyon protokolü ihtiyacı doğurmaktadır. SNP temelli genotip karakterizasyonunda kullanılan DNA çipleri ve allel-spesifik PCR, fazla ürün elde edilmesi ve otomasyona uygunluğu açısından dikkat çekmektedir (Sobrinho ve ark., 2005).

3.7. Organel Mikrosatellitleri

Bitki organel genomları (kloroplast DNA-mitokondriyal DNA) popülasyon genetiği çalışmaları ve filogenetik akrabalık ilişkilerinin ortaya çıkarılmasında yaygın olarak kullanılmaktadır (Soltis ve ark., 1992). Organel genom kalıtımı pek çok bitkide anneye bağlı olarak gerçekleşmekte, kloroplast ve mitokondri allelleri çekirdek allellere göre farklı bir genetik yapı sergilemektedir (Provan ve ark., 1999a, 1999b). Çekirdek mikrosatellitleri yanında, bitki popülasyon genetiği, filogenetik ve evrimsel genetik çalışmalarında kullanılmak amacıyla kloroplast mikrosatellit (cpSSR) ve mitokondri mikrosatellit (mtSSR) temelli markörler geliştirilmiştir. Kloroplast mikrosatellitleri, pek çok bitki türünde sitoplazmik varyasyonların ortaya çıkarılmasında kullanılan etkili birer araçlardır (Provan ve ark., 2001). Kloroplast mikrosatellitler, üreme sistemleri çalışmaları, polen ve tohum yoluyla gen akış oranlarının tespiti ve türler arası hibridizasyon çalışmalarında, genetik çeşitlilik çalışmalarında, filocoğrafik çalışmalarda etkili olarak kullanılmaktadırlar (Agarwal ve ark., 2008). Bitkilerdeki mtDNA hayvan hücrelerindeki mtDNA'ya göre daha karmaşık ve büyüktür. Bunun yanında, dairesel

kromozom şeklindeki mtDNA moleküler bir heterojenlik göstermekte ve yüksek orandaki reorganizasyon yeteneğinden dolayı bitki filogenetik çalışmalarında çok tercih edilmemektedir (Palmer, 1992). Özellikle açık tohumlu bitkilerde popülasyon farklılaşmalarının araştırılmasında heterojen özelliklerinden dolayı sıkça kullanılmaktadır (Sperisen ve ark., 2001).

3.8. CAPS (Kesilip Çoğaltılmış Polimorfik Diziler)

PCR-RFLP olarak da bilinen CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence), uygun primerler kullanılarak PCR ile çoğaltılmış DNA bölgelerinin restriksiyon enzimleriyle (endonükleaz) parçalanmasına dayanan ve sonucunda DNA parçacık uzunluk polimorfizminin elde edildiği bir tekniktir. DNA üzerinde meydana gelen SNP gibi tek nükleotid değişimleri ve eklenme-silinmeler (InDel) endonükleazların tanıma bölgelerini değiştirerek farklı uzunlukta DNA parçalarının oluşmasına neden olmaktadır. Lokus-spesifik PCR ürünlerinin bir veya birden fazla endonükleazla parçalanmasıyla oluşan ürünlerin agaroz veya poliakrilamid jelde yürütülmesine dayanmaktadır. CAPS markörleri kodominant, lokus spesifiktir ve homozigot-heterozigot allel ayrımını rahatlıkla yapabilmektedir (Konieczny ve Ausubel, 1993). CAPS metodunun avantajları arasında çok düşük miktarda DNA'ya ihtiyaç duyulması, kodominant allel ayrımını yapabilmesi, basit ve ucuz olması sayılabilir. Mutasyonlara bağlı olarak meydana gelen DNA dizi değişimleri endonükleazların tanıma bölgelerini etkileyerek sınırlayıcı etki oluşturabilmekte ve bundan dolayı SSR ve AFLP gibi yüksek polimorfizm elde edilmesini engellemektedir. Buna rağmen CAPS, gen haritalama çalışmalarında, moleküler tanımlama çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Weiland ve Yu, 2003).

3.9. SRAP (Dizi İlişkili Çoğaltılmış Polimorfizm)

SRAP (Sequence-Related Amplified Polymorphism), açık okuma bölgelerini (ORF) hedef alan PCR temelli bir markör sistemidir ve ön primerler 17 nükleotitten, ters primerler 18

nükleotitten meydana gelmiştir. Bu primer çeşitlerinde 5' ucunda 14 nükleotitten meydana gelen çekirdek dizinin (core sequence) spesifik olmayan 10–11 bazlık kısmına doldurma diziler (filler sequence), bu diziyi takiben ön primerler için CCGG dizisi, ters primerler için AATT dizisi gelmektedir. Çekirdek diziyi takiben çeşitlenmeyi sağlayan 3' ucunda üç seçici nükleotidden meydana gelen dizilerin bulunduğu primerler tasarlanmıştır. Ön ve ters primerlerin doldurma dizilerinde en azından 10–11 nükleotid çeşidi birbirinden farklıdır. CCGG açısından zengin olan ön primerler genelde ekzonları, AATT bakımından zengin olan ters primerler genelde intron ve promotorları hedef almaktadır. SRAP tekniği, basit, ucuz, polimorfizm oranı yüksek, gen etiketleme ve cDNA parmak izi çalışmalarına uygun, seçilen bantların dizilenmesi açısından kolaylıklar barındırmaktadır (Li ve Quiros, 2001) ve farklı bitki türlerinde genetik haritalama, gen etiketleme ve genetik çeşitlilik çalışmalarında kullanılmaktadır (Budak ve ark., 2004; Filiz ve ark., 2009).

3.10. Markör Teknolojilerinde EST (İfade Edilmiş Dizi Etiketleri) Kullanımı

Kodlama yapan genom bölgeleri mesajcı RNA'ya transkripte olarak protein sentezi için kalıplık görevi görmektedir ve günümüzde ters transkriptaz enzimi kullanarak RNA'dan komplementer DNA (cDNA) elde edilmektedir. cDNA RNA'dan üretilen kararlı bir yapı olup, yapısındaki intronlar kırılarak (splicing) ekzonlardan oluşmuş, anlatımı yapılan bir genin dizilenmesi ile 5' EST veya 3' EST (Expressed Sequence Tag) olarak ifade edilirler (Jongeneel, 2000). 5' EST genelde kodlama yapan bölgelerden (ekzon) elde edilir ve bu bölgeler genelde türler arası korunmuştur ve gen aileleri içinde çok fazla değişmezler. 3' genelde kodlama yapmayan bölgelerde (intron) veya translasyona uğramayan bölgelerden (UTR) elde edilir ve kodlama yapan bölgelere oranla türler arasında daha az korunaklıdır. Günümüzde EST belirlenmesi çok hızlı ve kolay şekilde yapılabilmekte, dijital veri bankalarında yaklaşık 6.5 milyon EST dizisi bulunmaktadır. EST dizileri, gen transkriptlerinin belirlenmesi, gen keşifleri, gen anlatımı ve düzenlenmesiyle ilgili bilgi

edinilmesinde, dizi belirlenmesinde ve EST temelli RFLP, SSR, SNP, CAPS gibi önemli moleküler markör sistemlerinin geliştirilmesinde bir araç olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, EST dizileri DNA mikroarray çalışmalarında gen anlatımlarının belirlenmesinde prob olarak, genetik bağlantı haritaları ve fiziksel haritaların oluşturulmasında da kullanılabilir (Kurata ve ark., 1997; Davis ve ark., 1999). EST dizileri SSR dizileri için yararlı bir kaynaktır ve çeşitli bitki türlerindeki EST dizilerinin yaklaşık %1-5 arası 20 baz çifti veya daha fazla uzunlukta SSR bölgeleri barındırmaktadır (Kantety ve ark., 2002). EST-SSR bölgeleri, transkripte olmayan bölgelere oranla daha korunaklı olan transkripsiyon bölgelerinde bulunmakta ve yakın türlere transferleri mantıklı görünmektedir. EST dizilerinden elde edilen primerler kullanılarak ilgili bölgenin çoğaltılması ve dizilenerek kıyaslanması pek çok SNP'yi ortaya çıkarabilir. Temel olarak, EST markörleri ilgi alanındaki spesifik genlerin klonlanmasında, komple genom dizilenmesinde, çeşitli akraba organizmalardaki fonksiyonel genlerin haritalanmasında çok popülerdir (Kesawat ve Das, 2009).

3.11. TRAP (Hedef Bölge Çoğaltım Polimorfizmi)

TRAP (Target Region Amplification Polymorphism) tekniği, PCR temelli hedefteki aday gen bölgeleri için polimorfik markör üretmek amacıyla biyoinformatik araçların ve EST veri bankalarının kullanılarak gerçekleştirilen hızlı ve etkili bir yöntemdir (Hu ve Vick, 2003). Markör üretmek için iki çeşit 18 nükleotid uzunluğunda primerler kullanılır. Primerler biri, veri bankasındaki EST dizilerine göre tasarlanmış sabit primerdir, diğer primer ise AT veya GC bakımından zengin çekirdek bölge taşıyan ekzon veya intronları hedef alan primerdir. TRAP tekniği, spesifik gen dizilerine yönelik genetik markör üretiminde, germplazm genotip karakterizasyonlarında ve markör yardımıyla ıslah çalışmalarında agronomik açıdan önemli karakterlerle ilgili genetik markörlerin üretilmesinde kullanılmaktadır (Hu ve ark., 2005).

4. Sonuç

Genetik varyasyon kısaca DNA yapısındaki varyasyonların toplamı olarak ifade edilebilir. DNA dizisindeki değişimler aynı çerçeve içinde veya çerçeve kayması şeklinde etkisini gösterebilir ve bu değişimler nokta mutasyon, eklenme-silme (InDel), transkripsiyon, translasyon veya protein yapısını etkileyecek değişik formlarda meydana gelebilir. Bu değişimlerin pek çoğu nötral değişimlerdir yani değişimler kendilerini fenotipte ortaya çıkarmamakta, gen veya tekrarlanan DNA bölgelerinde küçük değişimler olarak ortaya çıkabilmekte ve organizmanın fizyolojisinde zararlar oluşturmamaktadır. Restriksiyon enzimleri, DNA parçalarının jel yardımıyla ayrımı, Southern hibridizasyonu, PCR ve etiketli problemler gibi araçlar moleküler markör tekniklerinin başarıyla uygulanmasına imkan sağlamaktadır (Jones ve ark., 2009). Günümüzde çok sayıdaki moleküler markör tekniklerinin geliştirilmesi sonucunda, bitki ve hayvan popülasyonlarının genetik analizleri, evrimsel ve ekolojik çalışmaların sayıları çok büyük bir hızda artmıştır. Her bir moleküler markör tekniğinin kendine özel prensipleri mevcut olup, temel sorunun farklı markör tekniklerinden en uygun olanın seçilmesi gözükmektedir. Moleküler markörlerde aranan özellikler, yüksek polimorfizm, kodominant kalıtım, genomda sık dağılım göstermesi, kolay ve hızlı olması, düşük maliyet ve tekrarlanabilir olması, popülasyonlar ve türler arası transfer olabilmesidir. Fakat bu özelliklerin tümüne birden sahip olan hiçbir markör sistemi bulunmamakta ve bu yüzden yapılacak çalışmalarda markör sistemi seçilirken en fazla sayıda istenilen özelliği barındıran teknik tercih edilmelidir. Moleküler markörler, bitki varyetelerindeki ıslah ve markör yardımıyla seleksiyon çalışmalarında, filogenetik çalışmalarda, evrimsel ilişkilerin araştırılmasında etkili bir şekilde kullanılmaktadır. Geçmişteki evrimsel teoriler genelde morfolojik ve coğrafik farklılaşma temeline dayanmaktayken, moleküler biyolojideki son ilerlemeler genetik yapıların detaylarının aydınlatılmasını kolaylaştırmıştır. Pek çok sayıdaki PCR temelli markör teknikleri ve DNA dizileme teknolojileri çok çeşitli canlı

türlerinin filojenilerinin oluşturulmasına imkân tanımıştır (Slatkin, 1987). RFLP, ilk moleküler markör tekniği olup bitkilerde fiziksel haritalamada kullanılmış ve PCR teknolojisinin keşfiyle beraber RAPD, AFLP, SSR gibi teknikler geliştirilmiş, bu teknikler popülasyon genetiği çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Althoff ve ark., 2007). Kloroplast ve mitokondri SSR markörleri ebeveyn ilişkilerinin aydınlatılmasına yardımcı olarak ıslah ve evrimsel genetik çalışmalarına katkı sağlamaktadır. CAPS ve SNP gibi lokusa özel markörler, popülasyon gen havuzlarının allel varyasyonlarının tespitine yardımcı olmaktadır. Germplazm kaynaklarının genetik çeşitlilik seviyesinin değerlendirilmesinde, elit genotiplerin korunması ve belirlenmesinde, özellikle de kültür bitkilerinin ıslahında moleküler markörlerin katkısı çok önemlidir. Günümüzde gün geçtikçe sayısı artan ve fazlaşan genom ve cDNA kütüphaneleri, EST dizileri gibi dijital veri bankası kaynakları gelecekteki yapılacak germplazm korumalarına ve bitki çalışmalarına büyük destek sağlayacaktır (Agarwal ve ark., 2008). Moleküler markörler son yıllarda küresel düzeyde tehlike olan iklimsel değişikliklere bitkilerin verdiği cevapların araştırılmasında da etkin olarak kullanılmaktadır. Küresel ısınma gibi değişikliklere maruz kalan bitkilerde mikro coğrafik olarak genetik değişikliklerin oluştuğu markör çalışmalarıyla ortaya çıkarılmıştır. Çevresel ve diğer değişikliklerin meydana getirdiği genetik yapı değişimlerinin ortaya çıkarılmasında da moleküler markörler hayati öneme sahiptir (Jump ve Peñuelas, 2005). Sonuç olarak, moleküler markör teknolojileri bitki biyoteknolojisi çalışmalarına yeni boyutlar kazandırmış, bitki genetiği, bitki ıslahı ve bitki genomik çalışmalarına büyük katkılar sağlamıştır.

Kaynaklar

- Agarwal, M., N. Shrivastava ve H. Padh, 2008. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Rep*, 27, 617–631.
- Althoff, D.M., M.A. Gitzendanner, K.A. Segraves, 2007. The utility of amplified fragment length polymorphisms in phylogenetics: a comparison of homology within and between genomes. *Syst Biol*, 56, 477–484.
- Budak, H., R.C. Shearman, I. Parmaksiz, R.E. Gaussoin, T.P. Riordan, I. Dweikat, 2004. Molecular characterization of Buffalograss germplasm using sequence-related amplified polymorphism markers. *Theor Appl Genet*, 108, 328–334.
- Caetano-Anolles, G., B.J. Bassam, P.M. Gresshoff, 1991. DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. *Biotechnol*, 9, 553–557.
- Ching, A.D.A., Caldwell K.S., Jung M. ve ark., 2002. SNP frequency, haplotype structure and linkage disequilibrium in elite maize inbred lines. *BMC Genet*, 3, 19.
- Davis, G.L., M.D. McMullen, C. Baysdorfer, T. Musket, D. Grant ve ark., 1999. A maize map standard with sequenced core markers, grass genome reference points, and 932 expressed sequence tagged sites (ESTs) in a 1736 locus map. *Genetics*, 152, 1137–1172.
- Desplanque, B., P. Boudry, K. Broomberg, P. Saumitou-Laprade, J. Cuguen, H. Dijk, 1999. Genetic diversity and gene flow between wild, cultivated and weedy forms of *Beta vulgaris* L. (*Chenopodiaceae*), assessed by RFLP and microsatellite markers. *Theor. Appl. Genet.*, 98, 1194–1201.
- Filiz, E., B.S. Ozdemir, M. Tuna, H. Budak, 2009. Diploid *Brachypodium distachyon* of Turkey: Molecular and Morphological analysis, Molecular Breeding of Forage and Turf, ed: Yamada T. and Spangenberg G., Springer Science, Pp: 83.
- Freudenreich, C.H., J.B Stavenhagen., V.A. Zakian, 1997. Stability of a CTG:CAG trinucleotide repeat in yeast is dependent on its orientation in the genome. *Mol. Cell Biol.*, 4, 2090–2098.
- Gupta, M, Y.S. Chyi, J. Romero-Severson, J.L. Owen, 1994. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple sequence repeats. *Theor. Appl. Genet.*, 89, 998–1006.
- Hu, J. ve B.A Vick, 2003. Target region amplification polymorphism: a novel marker technique for plant genotyping. *Plant Mol Biol Rep*, 21, 289–294.
- Hu, J., O.E Ochoa, M.J. Truco, B.A. Vick, 2005. Application of the TRAP technique to lettuce (*Lactuca sativa* L.) genotyping. *Euphytica*, 144, 225–235.
- Jeffreys, A.J., V. Wilson, S.L. Thein, 1985. Hypervariable “minisatellite” regions in human DNA. *Nature*, 314, 67–73.
- Jones, N., H. Ougham, H. Thomas, I. Pašakinskienė, 2009. Markers and mapping revisited: finding your gene. *New Phytologist*, 183, 935–966.
- Jongeneel, C.V., 2000. Searching the expressed sequence tag (EST) databases: panning for genes. *Brief Bioinform* 1: 76–92.
- Joshi, S.P., V.S. Gupta, R.K. Aggarwal, P.K. Ranjekar, D.S. Brar, 2000. Genetic diversity and phylogenetic relationship as revealed by inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism in the genus *Oryza*. *Theor. Appl. Genet.*, 100, 1311–1320.

- Jump, A.S. ve J. Peñuelas, 2005. Running to stand still: adaptation and the response of plants to rapid climate change. *Ecol. Lett.*, 8, 1010–1020.
- Kantety, R.V., M.L Rota., D.E. Matthews, M.E. Sorrells, 2002. Data mining for simple-sequence repeats in expressed sequence tags from barley, maize, rice, sorghum, and wheat. *Plant Mol. Biol.*, 48, 501–510.
- Kesawat, M.S. ve B.K Das, 2009. Molecular Markers: It's Application in Crop Improvement. *J. C 213 Biotech.*, 12 (4), 169 -181.
- Konieczny, A. ve F.M. Ausubel, 1993. Procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using codominant ecotype-specific PCR-based markers. *Plant J*, 4, 403–410.
- Kurata, N., Y. Umehara, H. Tanoue, T. Sasaki, 1997. Physical mapping of the rice genome with YAC clones. *Plant Mol. Biol.*, 35, 101–113.
- Li, G. ve C.F. Quiros, 2001. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brassica*. *Theor Appl Genet*, 103, 455–546.
- Matsuoka, Y., S.E. Mitchell, S. Kresovich, M. Goodman, J. Doebley, 2002. Microsatellites in *Zea*-variability, patterns of mutations and use for evolutionary studies. *Theor. Appl. Genet.*, 104, 436-450.
- Mian, M.A.R., A.A. Hopkins., J.C. Zwonitzer, 2002. Determination of genetic diversity in tall fescue with AFLP markers. *Crop Sci*, 42, 944–950.
- Miller, J.C. ve S.D. Tanksley, 1990. RFLP analysis of phylogenetic relationships and genetic variation in the genus *Lycopersicon*. *Theor. Appl. Genet.*, 80, 437–448.
- Mullis, K.B. ve F. Faloona, 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase chain reaction. *Methods Enzymol*, 155, 350–355.
- Nakamura, Y., M. Leppert, P. O'Connell, R. Wolff ve ark., 1987. Variable number tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. *Science*, 235, 1616-1622.
- Palmer, J.D., 1992. Mitochondrial DNA in plant systematics: applications and limitations. *Molecular Systematics of Plants*, edited by P.S. Soltis, D.E. Soltis and J.J. Doyle, Chapman & Hall, London, 36–39.
- Powell, W., G.C. Machray, ve J. Provan, 1996. Polymorphism Revealed by Simple Sequence Repeats. *Trends in Plant Science*, 1(7), 215-221.
- Provan, J., J.R. Russell, A. Booth, W. Powell, 1999a. Polymorphic chloroplast simple-sequence repeat primers for systematic and population studies in the genus *Hordeum*. *Mol Ecol*, 8, 505–511.
- Provan, J., N. Soranzo, N.J. Wilson, D.B. Goldstein, W.A. Powell, 1999b. Low mutation rate for chloroplast microsatellites. *Genetics*, 153, 943–947.
- Provan, J., W. Powell, P.M. Hollingsworth, 2001. Chloroplast microsatellites: new tools for studies in plant ecology and systematics. *Trends Ecol Evol*, 16, 142–147.
- Sachidanandam, R., Weissman D., Schmidt S.C. ve ark., 2001. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature*, 409, 928– 933.
- Schlotterer, C., 2004. The evolution of molecular markers-just a matter of fashion? *Nat. Rev. Genet.*, 5, 63-69.
- Slatkin, M., 1987. Gene flow and population structure of natural populations. *Science*, 263: 787–792.
- Sobrinho, B., M. Briona, A. Carracedo, 2005. SNPs in forensic genetics: a review on SNP typing methodologies. *Forensic Sci. Int.*, 154, 181–194.
- Soleimani, V.D., B.R. Baum, D.A. Johnson, 2003. Efficient validation of single nucleotide polymorphisms in plants by allele-specific PCR, with an example from barley. *Plant Mol Biol Rep*, 21, 281– 288.
- Soltis, D.E., P.S. Soltis, B.G. Milligan, 1992. Intra specific chloroplast DNA variation: systematics and phylogenetic implications. In: Soltis P.S., Soltis D.E. (eds.) *Molecular plant systematics*, Chapman and Hall, New York, 117–150.
- Sperisen, C., U. Buchler, F. Gugerli, G. Ma'tya's, T. Geburek, G.G. Vendramin, 2001. Tandem repeats in plant mitochondrial genomes: application to the analysis of population differentiation in the conifer Norway spruce. *Mol Ecol*, 10, 257–263.
- Sunyaev S., J. Hanke, A. Aydin, U. Wirkner, I. Zastrow, J. Reich, P. Bork, 1999. Prediction of nonsynonymous single nucleotide polymorphisms in human disease-associated genes. *J Mol Med*, 77, 754–760.
- Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, ve ark., 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.*, 23, 4407-4414.
- Weiland, J.J. ve M.H. Yu, 2003. A cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) marker associated with root-knot nematode resistance in sugarbeet. *Crop Sci*, 43, 814–881.
- Welsh, J. ve M. McClelland 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res*, 18, 7213–7218.
- Williams, J.G.K., A.R. Kublelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski, S.V. Tingey 1990. DNA polymorphism's amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.*, 18, 6531- 6535.
- Young, N.D., Menancio-Hautea D., Fatokun C.A., Danesh D. 1992. RFLP technology, crop improvement and international agriculture. In G Thottappilly, LM Monti, DR Moham, AW Moore, eds, *Biotechnology: Enhancing research on tropical crops in Africa*. Technical Center for Agriculture and Rural Cooperation, International Institute of Tropical Agriculture, 221–230.
- Zietkiewicz, E., A. Rafalski, D. Labuda, 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeats (SSR)-anchored PCR amplification. *Genomics*, 20, 176-183.